

6 Zusammenfassung

Ausgehend von der Annahme, daß nach Induktion durch Außenfaktoren der Prozeß der Hypobiose bei *D. viviparus* einer genetischen Regulation unterliegt, wurde eine vergleichende Untersuchung der Genexpression von Hypobiose induzierten, nicht Hypobiose induzierten und nicht mehr zur Hypobiose befähigten dritten *D. viviparus*-Entwicklungsstadien durchgeführt. Die zur Verfügung stehenden *D. viviparus*-Stämme wurden auf ihre Fähigkeit zur Hypobiose nach Induktion der Entwicklungshemmung bei infektiösen Larven des jeweiligen Stammes durch sechswöchige Kühlung bei 4 °C überprüft. Nach Infektion empfänglicher Tiere und anschließender Sektion wurde beim *D. viviparus*-Feldstamm die Fähigkeit zur Entwicklungshemmung und beim *D. viviparus*-Vakzinestamm der Verlust dieser Eigenschaft bestätigt. Die vergleichende Untersuchung der Genexpression Hypobiose induzierter und nicht Hypobiose induzierter dritter Larvenstadien des *D. viviparus* Feld- wie Vakzinestammes fand unter Anwendung der Differential Display Reverse Transcription PCR (DDRT-PCR)-Technik statt. Nach Optimierung der Methode konnten 37 differentielle, für Hypobiose induzierte *D. viviparus*-Feldstammlarven spezifische Banden im Differential Display-Gel detektiert, 29 dieser isolierten cDNA-Fragmente reamplifiziert und 22 von diesen nach Klonierung sequenziert werden. Der Identitätsvergleich der erhaltenen cDNA-Fragmente mit bereits publizierten DNA-Sequenzen erbrachte in sieben Fällen aussagekräftige Übereinstimmungen zu bekannten Genen oder deren Genprodukten. Es lagen Übereinstimmungen zur Serine/Threonin-Protein-Kinase von *Saccharomyces cerevisiae*, zu einer Phosphotyrosin-Phosphatase von *Drosophila melanogaster*, einer Protein-Kinase und Protein-Tyrosin-Phosphatase von *Dictyostelium discoideum* und Microtubuli assoziierten Proteinen von *Caenorhabditis elegans* vor. Dieses sind Proteine, die an der Signalregistrierung, Verarbeitung und Reizbeantwortung der Zelle oder des Zellverbandes des Organismus beteiligt sind. Weiterhin bestanden Übereinstimmungen zum 'Cold shock like Protein' von *Bacillus cereus* und einem 'Potassium Transporter Gen' von *Saccharomyces cerevisiae*, denen eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Grundfunktionen der Zelle während des Prozesses der Entwicklungshemmung zugeschrieben werden kann. Identitäten zum 'Outer Surface Protein F' von *Borrelia burgdorferi* konnten nicht mit dem Vorgang der Hypobiose in Zusammenhang gebracht werden. Ergänzend erbrachte eine spezifische PCR mit entsprechenden Primern für

die sogenannten Dauerform (*daf*)-Gene *daf-1*, *daf-4* und *age-1* unter Einsatz von genomischer sowie cDNA von *D. viviparus* Amplifikate. Den *daf*-Genen wird beim freilebenden Erdnematoden *Caenorhabditis elegans* eine Mitwirkung bei der Entwicklungshemmung zugeschrieben. Diese Gene kodieren ebenfalls für Proteine, die in die Signaltransduktion involviert sind.

Ausgehend von den über die Differential Display RT-PCR-Technik ermittelten DNA-Sequenzen sollten die identifizierten Genfragmente durch Anwendung der 3' und 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' bzw. 5' RACE) und durch eine *spliced leader1* (SL1) spezifische PCR komplettiert werden. Sowohl über die Methode der 3' RACE als auch über die der 5' RACE und der SL1-PCR war eine spezifische Amplifikation sich in 3' oder 5' Richtung an die DDRT-PCR-cDNA-Fragmente anschließender DNA-Sequenzen jedoch nicht möglich. Eine Verifizierung der DDRT-PCR-cDNA-Fragment-Sequenzen mittels spezifischer RT-PCR konnte nicht erreicht werden.

Wenngleich bei der Durchführung der Differential Display-Methode eine große Störanfälligkeit festgestellt wurde und eine nähere Charakterisierung und Verifizierung der ermittelten differentiellen cDNA-Fragmente nicht möglich war, können die erhaltenen Ergebnisse mit Einschränkung als erste Hinweise einer genetischen Regulation der Entwicklungshemmung bei *D. viviparus* gewertet werden und als Grundlage für weiterführende Untersuchungen der Hypobiose bei *D. viviparus* auf molekulargenetischer Ebene dienen.

7 Summary

Susanne Rickling (1999):

Differences in gene expression of persistent and non-persistent larvae of *Dictyocaulus viviparus*.

The gene expression of hypobiosis induced, not induced larvae and larvae which have lost the ability for hypobiosis was compared, assuming that the induction of arrested development of *D. viviparus* induced by external factors is genetically regulated. First, the ability of the *D. viviparus* strains for arrested development was tested. Hypobiosis of the infective larvae was induced by low temperature (4 °C, 6 weeks) and confirmed by experimental infection of susceptible calves and subsequent necropsy. The gene expression of hypobiosis-induced, not induced and not inducible third larvae of *D. viviparus* was examined by Differential Display Reverse Transcription PCR (DDRT-PCR). After a general optimization of the method, 37 hypobiosis-induced *D. viviparus*-field strain larvae specific bands were detected in the differential display-gel. From these, 29 cDNA-fragments could be reamplified and sequenced after cloning. In seven cases, identities between the gene fragments and published sequences revealed coding sequences. Identities exist to a serine/threonine-kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, to a phosphotyrosin-phosphatase of *Drosophila melanogaster*, a protein-kinase and protein-tyrosin-phosphatase of *Dictyostelium discoideum* and two microtubuli associated proteins of *Caenorhabditis elegans*. These proteins are involved in the signal transduction of cells or tissues. In addition, there are identities to a cold shock-like protein of *Bacillus cereus* and to a potassium transporter gene of *Saccharomyces cerevisiae*. They may stabilize the basic functions of the cells during arrested development. There is also an identity to the outer surface protein F of *Borrelia burgdorferi* which is probably not involved in the process of hypobiosis. Furthermore, a PCR product was amplified with specific primers of so called *daf* (dauer formation) genes *daf-1*, *daf-4* and *age-1*. These *daf*-genes take part in the process of hypobiosis in *Caenorhabditis elegans*. They were amplified from genomic DNA as well as in cDNA of *D. viviparus*. These genes are also coding for proteins which are involved in signal transduction.

The full length sequence of the genes should be identified by 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE, 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE) and a *spliced leader 1* (SL1) specific PCR. In the 3' RACE as well as the 5' RACE and SL1-PCR a specific amplification of the sequences at the 3' or 5' end could not be achieved. The DDRT-PCR fragments could not be confirmed in a specific Reverse Transcription PCR (RT-PCR).

Although the differential display technique is prone to false positives and the cDNA fragments could not be characterized further, these results point towards a genetic mechanism regulating arrest of development and will be basis for further investigations on the molecular mechanism of hypobiosis in *D. viviparus*.